

肿瘤光动力学疗法的机制

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭 迁

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 郑州大学医学院, 河南省医学科学研究所肿瘤病理室 河南省郑州市 450052

汲振余, 索振河, Nesland JM, 彭迁, 挪威奥斯陆大学国立肿瘤医院肿瘤研究所 奥斯陆 0310

通讯作者: 杨观瑞, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学医学院, 河南省医学科学研究所肿瘤病理室, yangquanrui@yahoo.com.cn

电话: 0371-66912679 传真: 0371-66912679

收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

光动力学疗法(PDT)是指利用光敏剂和光治疗浅表肿瘤的一种非手术疗法, 近 20 多年已应用于许多肿瘤的临床治疗。关于 PDT 的作用机制、影响疗效的因素和如何提高肿瘤细胞的应答是当今研究的主要内容。本文综合了国外近年在此方面的研究动态, 着重讨论了光敏剂和其亚细胞分布、光和氧等影响 PDT 效应的主要因素及线粒体、细胞表面受体、凋亡相关蛋白和细胞间质在 PDT 中的作用和机制, 并对未来的研究方向做一概述。

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 肿瘤光动力学疗法的机制. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1879-1884
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/20.asp>

0 引言

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是近 20 多年来应用于浅表肿瘤临床治疗的一种非手术替代疗法。选择性存积于肿瘤细胞内的光敏剂经特定波长的光照射激发后, 发生光物理化学反应, 产生活性氧分子和自由基等其他活性物质^[1], 导致肿瘤细胞凋亡或坏死;或通过破坏肿瘤组织内的微血管循环系统, 使肿瘤细胞缺氧或营养匮乏而衰竭。

目前肿瘤的传统疗法有手术、放疗和化疗。外科手术切除限于分界明显的肿瘤组织或早期癌灶组织, 但不可避免地会切除掉部分正常组织而损害其在机体内的正常功能^[2]。放疗和化疗的临床疗效虽然已得到肯定, 但其副作用较大, 由于光敏物质在肿瘤组织和细胞内的蓄积作用, 使病变组织内的药物浓度远大于邻近的正常组织, 因而经光照射后能选择性杀伤肿瘤细胞, 对正常细胞无或有极小的毒性作用, 相对无弥漫性损伤。另外 PDT 还能与肿瘤的传统疗法相结合, 如手术切除后结合使用 PDT 杀死残留的癌细胞, 可防止复发和扩散, 所以 PDT 可为临床医生提供另一种治疗选择。随着各国卫生组织的先后批准, PDT 已逐渐成为临床常用的备选治疗方式^[3], 包括晚期癌的姑息性治疗和早期癌及癌前病变的根治性治疗^[4]。

1 影响 PDT 效应的主要因素

1.1 光敏剂 光敏剂的物理化学特性直接决定了其光毒性作用。理想的光敏剂应具备以下特点: (1) 能较强地特异选择性积蓄于肿瘤细胞和组织内, 且在较短时间内达到高峰。 (2) 能从正常组织内迅速得到清除, 毒副作用小或无。 (3) 所需的光波长范围能最大限度穿透组织到深层。 (4) 纯度高。 (5) 反应性氧类产量高。肿瘤细胞这种选择性存蓄作用的机制目前还不太清楚, 但主要认为与肿瘤组织的生物学特性相关。如: 肿瘤组织有较大的间质体积; 淋巴通道排流能力差, 血管渗透能力强; 肿瘤组织比正常组织含有更多的巨噬细胞; 含更多的胶原蛋白和脂蛋白受体等^[5]。这些物理化学特性可能决定了肿瘤细胞吸收积累光敏剂的能力, 特别是肿瘤细胞膜表面丰富的脂蛋白受体似乎起了很大的作用^[6], 而且具有长烷基链的 ALA 脂类穿越生物膜屏障的速度更快^[7]。

人们称以 HPD 为基础的光敏物质为第一代。第一代光敏剂有其自身的缺陷, 如皮肤光毒性作用较强, 在体内代谢缓慢, 正常组织内滞留时间较长, 患者需 1 mo 以上的避光时间; 使用的光穿透力有限, 无法达到较深层的癌组织。于是人们开始研究使用第二代光敏剂, 如二氢卟吩(chlorin)类, 薹醌(purpurin)类, 苯基卟啉(benzoporphyrin)及 5-ALA 等。ALA-PDT 的优点是皮肤光毒性时间短, 仅为 1-2 d^[8]; 可局部应用也可口服, 使用方便; 短时间内可重复治疗。以后以 ALA 为基础又合成出 ALA 酯类衍生物, 如 ALA-hexylester, 显著增强了细胞内 PpIX 的累积效率。

1.2 光 PDT 对光源的要求一是光波穿透力要强, 能达到深层肿瘤组织, 二是能有效激发光敏剂。最初使用的光源是普通光附加合适的滤光片, 常用于皮肤肿瘤或其他体表病变的治疗。其特点是简单、实用、价廉, 但能产生热量, 难以确定准确的光剂量。对于脏器内腔表面肿瘤, 则需光纤内镜系统传送激光束。现在随着激光技术和光纤技术的应用, 使 PDT 技术几乎可以在内镜下把光输送到体内任何部位。最常使用的激光就是氦染料激光和磷酸钛钾(KTP)染料激光。广泛使用的氦染料激光器能调整输出波长, 适用于各种光敏剂。半导体激光简单, 体积小, 不需冷却装置, 因此易于携带, 缺点是输出功率有限。二极管激光器仅能发射单一波长的激光, 只能适用于特定光敏剂的 PDT。光照剂量的选择主要根据光敏剂的不同而不同, 通常在 10-500 J/cm² 之间。

1.3 氧 由于光敏剂受光激发后产生的细胞毒性作用机制

之一就是依赖单态氧的产生. 因而组织中氧分子浓度直接决定了PDT的效应. 然而实质瘤中往往存在缺氧状态, 肿瘤组织的氧水平是临床上必须关注的指标. 缺氧由供氧和耗氧的失衡而引起. 肿瘤组织微血管结构与功能的异常, 因肿瘤细胞的快速增生导致的氧扩散距离不断加大, 治疗过程中对氧的剥夺(如PDT)等, 均可造成缺氧状态^[9]. 缺氧使细胞内的许多基因活性改变, 导致蛋白质表达水平变化, 一方面使细胞周期停止, 造成分化、凋亡或坏死; 另一方面又能使细胞生物学性状改变, 适应了缺氧和营养匮乏的状况, 使肿瘤细胞更能抵抗恶劣的外部环境, 增强了细胞的恶性增殖和远处转移能力^[10], 这有可能是抵御PDT作用的原因之一. PDT过程中光的流速(light fluence rate)大小能影响到肿瘤组织内的氧浓度水平^[11]. 高流速的光产生了高浓度的单态氧, 却导致了氧的快速耗尽, 使氧无法扩散到较深部的癌组织, 使肿瘤组织内缺氧范围增大, 造成PDT效应减弱^[11].

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是细胞缺氧信号转导途径中的主要转录因子, 能结合到所调控基因的启动子或增强子的缺氧反应元件, 导致基因的转录活化^[12]. HIF能激活许多基因的表达, 如促红细胞生成素、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶2(MMP2), 还有一些与糖运输和糖酵解有关的酶类, 均与细胞的存活、增殖、血管生成及迁移相关. 这可以解释为何许多缺氧的实体瘤HIF-1 α 的过表达与放化疗预后差相关. Koukourakis *et al*^[13]报道食管癌患者51%高表达HIF-1 α , HIF-1 α 高表达与PDT低完全应答率(CR)相关, 其原因一是肿瘤组织内低氧状态可能使PDT不能产生大量的单态氧, 使PDT毒性效应下降; 二是高表达的HIF-1 α 可能使细胞抗凋亡能力增强.

HIF-1 α 对细胞凋亡的作用存在两种相反的观点. 一种观点认为HIF-1 α 能抑制细胞凋亡. Akakura *et al*^[14]在缺氧条件下培养前列腺癌细胞, 发现高表达HIF-1 α 的前列腺癌细胞的增殖活性要大于低表达HIF-1 α 的前列腺癌细胞. 培养基中剥夺葡萄糖可造成低表达HIF-1 α 细胞的凋亡, 而对高表达HIF-1 α 的细胞影响不大. 利用表达载体把HIF-1 α cDNA转染到不表达HIF-1 α 的细胞中, 结果显著抑制了氧和葡萄糖缺乏诱导的细胞凋亡. Dong *et al*^[15]也发现缺氧能抑制星型孢菌素(staurosporine, STA)引起的肾近端小管细胞凋亡, 并证实与凋亡抑制蛋白IAP-2的高表达有关. 另外也有报道^[16]认为缺氧能诱导表达MC1-1(Bcl-2同源物), 降低Bax/Bcl-2比率, 均与抑制凋亡作用有关. 另一种实验结果则完全相反. Krick *et al*^[17]使大鼠肺泡上皮AT II细胞在缺氧条件下生长, 诱导HIF-1 α 的表达, 发现能使促凋亡蛋白Bnip3L表达上调, 细胞周期停滞, 细胞存活下降. 用小片段干扰RNA(siRNA)抑制HIF-1 α 的表达, 则抑制了对凋亡的诱导. 转染HIF-1 α cDNA使HIF-1 α 蛋白短暂高表达, 又增强

了细胞凋亡. HIF-1 α 对凋亡的诱导/抑制作用机制是下一步需要阐明的问题.

2 光敏剂在肿瘤细胞中的吸收和亚细胞定位

光敏剂的物理化学性质(如亲脂性能, 所带电荷等)决定了在细胞中的定位和分布浓度. 一般来说, 脂溶性光敏剂易结合到质膜和线粒体膜, 而水溶性光敏剂则主要位于溶酶体和肿瘤间质. 由于光动力学过程中产生的单态氧寿命非常短暂, 仅有0.05 μ s, 其扩散的距离也相应较短, 仅为0.02 μ s, 因而PDT的细胞毒性作用仅限于光敏剂所处的很小范围, 具有较高浓度光敏剂和较高浓度分子氧的细胞对PDT敏感性就强. 光敏物质在细胞内的定位可能决定是以凋亡为主还是以坏死为主. 因为研究^[18]发现, 结合到线粒体上的光敏剂主要诱导凋亡, 而结合到溶酶体上的光敏剂, 则在受光激发后破坏溶酶体膜结构, 释放出组织蛋白酶, 一方面能裂解caspase-3, 阻断了凋亡信号传导途径, 另一方面又裂解Bid产生较短的具有促凋亡活性的tBid, 参与了线粒体凋亡途径. 但总的来说还是以细胞坏死方式为主.

光敏剂的胞内定位还与细胞类型和/或孵育时间有关. Fabris *et al*^[19]用酞菁类光敏剂ZnPc(zinc phthalocyanine)与胚胎成纤维细胞4R孵育, 2 h后ZnPc出现在高尔基体和胞膜, 24 h后ZnPc出现在高尔基体和线粒体. 孵育2 h后进行PDT, 细胞死亡方式主要为坏死, 这是由于膜的完整性遭到破坏而引起. 孵育24 h后的PDT主要诱导细胞的凋亡. mTHPC在胞质中散在分布, 内质网、线粒体、高尔基体及核膜mTHPC均可定位, 因而mTHPC的主要作用靶点还不太确定, 但至少在鼻咽癌细胞系HK1和CNE2中线粒体是PDT的作用位点^[20].

5-ALA本身不具有光敏作用, 是内源性光敏物质PpIX的前体. ALA在胞质中经过胆色素原-尿卟啉-粪卟啉-原卟啉原III途径, 在线粒体内形成PpIX, 最后成为血红素(heme). 在血红素合成过程中有两个限速步骤^[21], 第一个是ALA的生成过程, 此过程受血红素的反馈抑制. 但在有外源性ALA存在的条件下, 则解除了这种合成抑制, 造成中间产物PpIX合成量增加. 第二个限速步骤是由原卟啉IX生成血红素的过程, 此过程由限速酶亚铁原卟啉合成酶调控. 由于肿瘤细胞和正常细胞血红素合成过程中的代谢酶活性有差异, 如具有低活性的亚铁原卟啉合成酶和高浓度的胆色素原脱氨酶^[8], 结果就促成了肿瘤细胞线粒体中高浓度的PpIX积累. 这些位于线粒体内膜的PpIX也可由于渗透等作用分布到胞膜或其他细胞器膜^[22]. PpIX的亚细胞定位还取决于细胞种类. Krieg *et al*^[23]发现, PpIX在分化好的结肠腺癌HT29细胞中主要结合于胞膜上, 在PDT(LD₅₀剂量)后膜的完整性受破坏最大. 在分化差的SW480细胞中, PpIX主要分布于线粒体, PDT后主要表现为线粒体活性的丢失.

3 光敏剂的光动力效应机制

3.1 I型与II型反应机制 光敏剂在相应波长的光激发下, 吸收光子的能量由基态升迁至极不稳定的激发态, 激发态的寿命非常短暂(10^{-6} – 10^{-8} s), 在返回基态的过程中产生荧光, 这是肿瘤诊断的基础. 同时激发态的光敏剂也可形成三价态, 并与周围的化学物质产生反应, 形成所谓的I型与II型光动力反应机制. I型反应机制主要是指激发态的光敏剂与相邻物质发生电子或氢原子转移形成的氧化还原反应, 导致自由基或自由基离子的产生. 在此过程中也有氧的参与, 产生过氧化物, 超氧离子和羟自由基等. II型光动力反应机制则主要是三价态光敏剂把能量传递给分子态的氧, 产生单态氧^[24].

在I型与II型机制中所产生的这些活性氧类(reactive oxygen species, ROS)能氧化细胞中的生物大分子, 如蛋白、脂肪酸及蛋白间的桥连结构, 破坏生物分子的结构和功能, 改变生物膜渗透性和流动性, 激活或抑制了膜上的酶蛋白和受体, 最终引起细胞的凋亡与坏死. PDT引起的细胞坏死主要是由于光敏剂剂量过大, 光照剂量过强所引起的细胞快速死亡, PDT引起的细胞凋亡被认为是临床上PDT发挥效应的重要方式. 细胞是凋亡还是坏死取决于光敏剂的种类、光剂量大小和细胞种类.

3.2 线粒体在凋亡中的作用 线粒体在PDT诱导的细胞凋亡中起很重要的作用, 这主要与许多光敏剂在线粒体的定位有关. 在线粒体中产生的内源性光敏剂如血红素合成过程中的中间产物PpIX, 或结合于线粒体膜上的光敏剂在光的作用下, 能使线粒体膜的通透性增加, 膜电位($\Delta\psi_m$)消失, 使膜腔中的许多与诱导细胞凋亡相关的蛋白因子释放于胞质中. 这些因子包括细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)和SMAC(second mitochondria-derived activator of caspases)等. 研究发现在线粒体膜上的渗透性转运孔道复合体(permeability transition pore complex, PTPC)在凋亡因子释放过程中起重要作用. PTPC的具体结构尚不完全清楚, 但至少知道由三个穿膜蛋白组成, 分别是腺苷酸转运子(ANT)、膜电压依赖性离子通道(VDAC)及PBR(peripheral benzodiazepine receptor). PTPC负责质子的正常穿膜运输, 受pH、ATP/ADP局部浓度和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度调节. 当PTPC开放时, 使 H^+ 在膜两侧浓度梯度消失, 即造成了膜电位的消失和 Ca^{2+} 释放, 导致细胞色素C进入胞质, 与胞质中的dATP、凋亡活化因子-1(Apaf-1)及原caspase-9结合成复合物, 启动了caspase的级联活化, 最终使许多蛋白因子活化^[25], 如DNA裂解因子(DNA fragmentation factor, DFF)、PARP[poly(ADP-ribose)polymerase]、DNA依赖蛋白激酶(DNA-PKcs)和ICAD(inhibitor of caspase activated DNase)等, 引起细胞凋亡特征的产生, 如细胞收缩、染色质凝聚并边缘化、DNA断裂和凋亡小体形成等.

PBR分子量为 M_r 18000, 主要位于线粒体外膜. PBR能把PpIX的前体粪卟啉原III穿膜运输至线粒体内的PpIX合成位点, 并能结合包括PpIX在内的其他光敏剂^[26], 因而细胞中PBR蛋白表达水平的高低有可能决定了PpIX的合成效率或线粒体吸收结合光敏剂的能力, 最终有可能影响线粒体介导的PDT应答敏感性. 研究发现, 光敏剂与PBR的亲合活性与光动力杀伤作用相关^[27], 与PBR有更强亲和力的PK11195可以降低PDT的光毒作用, 提示PBR是PDT的重要靶部位.

关于PTPC造成线粒体膜电位消失的具体机制尚有争论. 一些实验发现, 阻止PTPC孔开放的特异性抑制剂并未抑制膜电位的消失^[28], Verteporfin-PDT处理的Hela细胞在膜电位并未发生任何变化的情况下, 也有细胞色素C从线粒体转移至胞质中. 因此关于线粒体途径诱导凋亡的机制仍需更多的研究. 另外Reiners *et al*^[29]利用能结合于溶酶体上的光敏剂Npe6处理肝癌细胞Hepa1c1c7, 在线粒体膜电位消失前也发现有细胞色素C的释放和caspase-9, -3的活化, 推测其原因可能是光敏作用破坏溶酶体, 释放出的蛋白酶降解Bid, 活性tBid引起了细胞色素C的释放, 提示很多因素可能与线粒体凋亡途径相关.

3.3 细胞表面受体和凋亡相关蛋白 当细胞外的信号配体与胞膜上的肿瘤坏死因子(TNF)受体结合时, 形成死亡信号复合体(death-inducing signaling complexes, DISCs), 能诱导细胞迅速凋亡. 人们研究较多的是FAS/CD95/AP01和TNFR1/P55/CD120a. Ahmad *et al*^[30]实验证实, Pc4-PDT能引起人表皮样瘤A431细胞表面受体Fas和其配体FasL的短暂高表达, 并导致Fas多聚化及与胞内受体分子FADD(fas-associated protein with a death domain)的结合, Fas-FADD复合物能结合原caspase-8, 使其自我激活, 启动了死亡信号传导途径. Ali *et al*^[31]观察到人鼻咽癌(NPC)细胞用Hypocrellin A(HA)和HB处理, 光激活HA, HB后增强了Fas/FasL表达, 诱导了Fas信号依赖的细胞凋亡. 但Zhuang *et al*^[32]利用结合于质膜上的光敏剂Rose Bengal, 对HL-60细胞进行PDT处理, 发现即便在无FasL的情况下也能直接引起Fas受体的多聚化, 并活化caspase-8. caspase-8裂解Bid, 形成较短的具有活性的C末端片段tBid, 作用于线粒体, 导致细胞色素C和AIF释放、caspase-3活化及相应的凋亡. Takahashi *et al*^[24]利用人角质形成细胞(NHK), 以ATX-SiO(Na)作为光敏剂进行PDT试验, 也发现在无FasL结合的情况下引起了Fas抗原的多聚化, 胞质中有细胞色素C的累积. 有人作出假设, 是单态氧引起了Fas/TNF受体的多聚和活化^[32]. 但这种假设还需更多实验数据去证实.

有关Bcl-2在PDT诱导的凋亡中的作用有截然不同的报道. 一方面, Bcl-2的高表达能抑制BPD-MA-PDT引起的白血病HL-60细胞的凋亡^[33], 其机制可能是通过抑

制 caspase-3 和 caspase-6 的激活, 或 PDT 依靠细胞周期依赖蛋白激酶(CDK1)途径对 Bcl-2 磷酸化, 使细胞阻滞于 G2/M 期^[34], 抑制了凋亡的发生. 结合于线粒体外膜上的 Bcl-2 也可能抑制了细胞色素 C 的释放, 其抑凋亡作用还可能与 Bcl-2 的抗氧化作用或能维持 Ca^{2+} 的稳定有关^[35]. 利用逆转录病毒载体把 Bcl-2 反义序列转染至胃腺癌 MGC803 细胞, 使 Bcl-2 蛋白表达降低, 能显著增强 PDT 的光毒作用^[36]. 另一方面, Kim *et al*^[37]报道, 高表达 Bcl-2 的人乳腺上皮 MCF10A 细胞能增强 PDT 诱导的凋亡. Crescenzi *et al*^[38]报道 PDT 能引起人 MCF-7 乳腺癌细胞 Bcl-2 短暂的选择性降解, 并上调 Bax, 因此使 Bax/Bcl-2 比率增加, 促进凋亡. 因此 Bcl-2 的作用相当程度上还要取决于其他促凋亡蛋白质的水平, 如 Bax. Chiu *et al*^[39]在人乳腺癌 MCF-7C3 细胞中观察到, 光敏剂 Pc4 受光的激发能使 Bax 从胞质溶胶移位到线粒体, 并引起细胞色素 C 释放. MCF-7C3 细胞用 Bax 反义寡核苷酸处理后能抑制 50% 的 PDT 引起的凋亡, Bax 阴性的人前列腺癌细胞 DU-145 经 PDT 后, 上述凋亡的主要标志均不存在, 提示促凋亡蛋白 Bax 低表达(低 Bax/Bcl-2 比率)能抵御 PDT 诱导的凋亡.

热休克蛋白 HSP-70 能与蛋白酶活化因子 Apaf-1 结合, 抑制了 Apaf-1/细胞色素 C/procaspase-9 蛋白复合体的形成, 也因此抑制了由细胞色素 C 释放引起的 caspase 的活化^[40, 41]. Kuzelova *et al*^[22]利用 ALA-PDT 处理白血病 K562 细胞, 能诱导细胞早期凋亡特征, 如 Bcl-x1 表达降低、线粒体膜电位下降和细胞色素 C 从线粒体释放入胞质等, 但却没有发现细胞晚期凋亡迹象, 如 caspase-3 未活化, DNA 也未降解. 细胞主要是由于质膜的破坏而坏死. 作者发现 K562 细胞有 HSP-70 和 HSP-27 的高表达, 推测是热休克蛋白阻断了 caspase 的活化. 可见 PDT 诱导的凋亡受许多因素的影响, 机制相当复杂.

3.4 肿瘤间质 细胞中的光敏剂受光的激发可直接对细胞产生毒性作用, 但这种直接效应是有限的. 有研究^[42]表明肿瘤间质在 PDT 中起重要作用, 是不可忽视的 PDT 效应因素. 肿瘤间质包括微血管系统、细胞成分和细胞基质, 对肿瘤细胞的生长至关重要. 当光敏物质进入血液后, 便根据各自不同的物理化学特性结合不同的血清蛋白, 便于被输送. 亲水性光敏物质主要由白蛋白和球蛋白运输至肿瘤组织的血管基质, 疏水性药物则易与低密度脂蛋白(LDL)结合, 最终定位于肿瘤细胞内部. 肿瘤间质组织结构特征, 如血管渗透性好, 淋巴引流差, 较大的空间, 大量巨噬细胞, LDL 受体丰富等, 利于肿瘤组织选择性积累光敏物质; 另外, 卟啉与网状蛋白, 胶原和弹性蛋白等有很高的亲和能力, 纤维蛋白和胶原是间质的重要成分, 而胶原和弹性蛋白则是血管壁的成分; 另外存在于基质中的高活性脂酶可能有利于 ALA-脂类的代谢. 所以间质在肿瘤组织积累光敏剂的过程中占有一定的比重.

肿瘤间质中的微血管是光敏物质选择性积蓄的一个场所, 所以是 PDT 效应部位之一. 对血管损伤的作用方式依赖于光敏剂的不同. Photofrin 或单天冬酰氨-二氢卟吩(mono-L-aspartyl chlorin)PDT 可引起血管收缩及血细胞凝集成血栓, 血液循环终止, 使肿瘤细胞因缺氧和营养剥夺而死亡; 酞菁类光敏剂(phthalocyanines, Pc)则引起血管崩漏^[43]. 光敏剂 AIPcSn 还能结合于内皮下层, 破坏了肿瘤细胞赖以生存的基础. 所以最有效的 PDT 应该是既能杀伤肿瘤细胞, 也能破坏肿瘤细胞的生存环境-间质. Peng *et al*^[44]把作用于肿瘤细胞的光敏剂 ALA 和能作用于肿瘤间质的光敏剂 Photofrin 同时应用于 PDT, 取得了较好的效果. Dolmans *et al*^[45]发现, 在同位移植的乳腺癌中使用光敏剂 MV6401, 15 min 后光敏物质分布于血管, 4 h 后则主要位于肿瘤细胞内. 分别在应用 MV6401 后 15 min 和 4 h 给予二次 PDT, 效果明显好于 15 min 或 4 h 的单次光照射, 提示破坏微血管是 PDT 的重要方式之一, 且 PDT 方案还可进行优化以达到最佳效果.

4 PDT的发展趋势—如何增强 PDT 效应

4.1 开发更有效的光敏剂 理想的光敏剂是决定 PDT 疗效的前提. 寻找安全、有效的光敏剂是重点研究内容之一. 新光敏剂的开发应注意以下几点: (1) 在肿瘤细胞中的亚细胞定位情况. 因为确切了解 PDT 的作用方式有助于调整 PDT 方案至最佳. (2) 对分子氧的依赖程度, 能否产生足量的单态氧. (3) 对人体的皮肤光毒作用和生理毒性情况. 最好在分布到肿瘤细胞前无光毒作用, 如以 ALA 为基础的一些衍生物. 金丝桃素(hypericin)对许多肿瘤细胞具有更强的光毒作用^[46], 但在临床上的应用还有待研究.

4.2 恢复细胞凋亡能力 凋亡能力的丧失是肿瘤细胞的一大特点^[47]. PDT 效应的重要机制之一就是诱导凋亡的产生, 因而恢复恶性肿瘤细胞的凋亡能力, 提高细胞对 PDT 等外界刺激的凋亡诱导敏感性, 是改善 PDT 临床疗效的重要手段. Barberi-Heyob *et al*^[48]将野生型 p53(wt p53)基因转移至 p53 突变的人结肠癌细胞系(HT29A4)中, PDT 后细胞凋亡明显增加, caspase 3 的活性增强了 2.6 倍. Usuda *et al*^[49]把白介素(IL)-6 基因转染至 Lewis 肺癌细胞(LLC), 发现对 PDT 毒性作用敏感性增强. IL-6 已知能通过降低 Bcl-2 的表达而诱导凋亡, 因而该结果提示通过调控某些基因的表达能降低肿瘤细胞对 PDT 应答的阈值.

4.3 与其他疗法相结合 Hirschberg *et al*^[26]在胶质瘤的 ALA-PDT 中, 把高热疗法(hyperthermia, HT)与 PDT 相结合, 显著增强了细胞毒性作用: HT 能抑制亚致死损伤细胞(如缺氧引起)的修复功能, 使细胞变得更加脆弱, 对 PDT 或放疗等更加敏感; 而 PDT 则引起某些蛋白, 特别是线粒体膜上一些酶的氧化损伤, 也使细胞对 HT 更敏感. 二者叠加可出现协同效应.

细胞分化疗法(differentiation therapy, DT)

能提高PDT效应的报道对临床有指导意义. 如前所述, 细胞线粒体膜上的PBR能运送血红素前体, 增加PpIX的合成, 而且与PpIX也有很高的亲和力. 在皮肤肿瘤中, 高分化的癌细胞PBR表达最高, 分化差的癌细胞和浸润型肿瘤细胞中PBR表达很低^[50], 这可能是造成高分化细胞积累较高浓度的PpIX原因之一. 利用诱导剂诱导肿瘤细胞的分化有可能提高细胞内PpIX水平, 进而改善PDT的细胞毒性作用. Ortel *et al*^[51]用人工合成的雄激素R1881与LNCaP前列腺癌细胞孵育进行分化诱导, 发现细胞内PpIX的产量是未分化处理细胞的28倍, 用514 nm的光照射后发现, 分化处理的细胞达到50%的细胞杀死效果所需的光剂量是未经分化处理细胞的1/50. 然而白血病细胞系HL-60用DMSO诱导分化后并未造成细胞内PpIX浓度的上升, 提示并不是所有类型的细胞都能用分化疗法提高PDT效果.

肿瘤选择性积累光敏剂依靠肿瘤组织的异常生物学特性, 这是非特异性积蓄效应, 在正常细胞中或多或少也存在光敏剂的分布, 所以仍难以避免其毒副作用. 利用单克隆抗体把光敏剂特异性输送至靶部位, 减少正常组织的光敏剂浓度并提高PDT的特异性是另外一个思路. 有人把这种方法叫做光免疫治疗(photoimmunotherapy, PIT)^[43]. Jiang *et al*^[52]把光敏剂BPD同表达于人肺鳞状细胞癌细胞表面糖蛋白的抗体(Mab5E8)相偶合, 发现BPD和BPD-Mab5E8的LD₅₀分别为150 g/L和10 g/L, 提示偶连有抗体的BPD有更强的细胞毒性作用. Hemming *et al*^[53]把BPD与抗表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体偶合, 注射于荷瘤仓鼠模型, 肿瘤中BPD的浓度是单纯BPD对照组的26倍, PDT后1 mo生存率BPD-抗-EGFR组为80%, BPD组为67%. 虽然一些体外实验显示良好的前景, 但仍存在许多问题^[43, 54]: 抗体和光敏剂偶合后由于分子内部和分子间的交联作用易使二者改变各自的特性, 并易引起水溶性下降; 抗体是 M_r 150 000的大免疫球蛋白分子(光敏剂分子量一般小于 M_r 1 000), 如此大的分子难以渗透至肿瘤组织内部及穿越生物膜进入细胞内部; 临床上肿瘤具有高度异质性, 不会持续高表达某一种特异靶抗原. 因此该方法还有待进一步评价. 另外光敏剂还可与一些血清蛋白如LDL、白蛋白和转铁蛋白等结合以提高运输能力; 还可与一些受体的配体如表皮生长因子(EGF)偶合以提高特异结合能力^[54].

总之, PDT由于其自身的特点和优势目前已得到越来越广泛的应用. 在某些领域如皮肤肿瘤和癌前病变的临床已成为常规性治疗措施. 但在另一些领域仍是空白^[7]. PDT能否成为肿瘤临床治疗的主流, 需依赖于更加理想的光敏剂的出现. 另外一些新技术的应用(如超声内镜)也可能促进PDT的发展. 相信随着新光敏剂的不断开发, 对PDT机制及影响因素的深入了解和治疗方案的不断完善, PDT会为肿瘤的临床治疗发挥更好的作用.

5 参考文献

- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 1978;36(7 Pt 1):2326-2329
- Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland JM, Peng Q. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors. *Int J Oncol* 2002;21:577-582
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:3-7
- Prosst RL, Wolfsen HC, Gahlen J. Photodynamic therapy for esophageal diseases: a clinical update. *Endoscopy* 2003;35:1059-1068
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905
- Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:917-927
- Xiang W, Weingandt H, Liessmann F, Klein S, Stepp H, Baumgartner R, Hillemanns P. Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. *Photochem Photobiol* 2001;74:617-623
- Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjorseth A, Nesland JM. Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 1996;34:95-96
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):4-9
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23:359-369
- Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, Morgan J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004;64:2120-2126
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004;36:1-12
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61:1830-1832
- Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-6554
- Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, Force T, Nishiyama J. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:18702-18709
- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro-or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64:889-892
- Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:395-403
- Kessel D, Luguya R, Vicente MG. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol* 2003;78:431-435
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 2001;61:7495-7500
- Yow CM, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW. Cellular

- uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett* 2000; 157:123-131
- 21 Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg Med* 2004;34:62-72
 - 22 Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:67-78
 - 23 Krieg RC, Messmann H, Schlottmann K, Endlicher E, Seeger S, Scholmerich J, Knuechel R. Intracellular localization is a co-factor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol* 2003; 78:393-399
 - 24 Takahashi H, Itoh Y, Miyauchi Y, Nakajima S, Sakata I, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10 (Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2003;295:242-248
 - 25 Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:59-86
 - 26 Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Yeh AT, Madsen SJ. Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *J Neurooncol* 2004;70:289-299
 - 27 Kessel D, Antolovich M, Smith KM. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74:346-349
 - 28 Chaloupka R, Petit PX, Israel N, Sureau F. Over-expression of Bcl-2 does not protect cells from hypericin photo-induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway. *FEBS Lett* 1999;462:295-301
 - 29 Reiners JJ Jr, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of procaspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002;9:934-944
 - 30 Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* 2000;115:1041-1046
 - 31 Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2002;9:257-270
 - 32 Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2000;275:25939-25948
 - 33 Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1999;79:95-100
 - 34 Vantieghe A, Xu Y, Assefa Z, Piette J, Vandenheede JR, Merlevede W, De Witte PA, Agostinis P. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277: 37718-37731
 - 35 Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2000;57:1-13
 - 36 Zhang WG, Ma LP, Wang SW, Zhang ZY, Cao GD. Antisense bcl-2 retrovirus vector increases the sensitivity of a human gastric adenocarcinoma cell line to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1999;69:582-586
 - 37 Kim HR, Luo Y, Li G, Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res* 1999;59:3429-3432
 - 38 Crescenzi E, Varriale L, Iovino M, Chiaviello A, Veneziani BM, Palumbo G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:537-544
 - 39 Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2003; 89:1590-1597
 - 40 Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2:469-475
 - 41 Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:839-843
 - 42 Peng Q, Nesland JM. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct Pathol* 2004;28:333-340
 - 43 van Dongen GA, Visser GW, Vroenenraets MB. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:31-52
 - 44 Peng Q, Warloe T, Moan J, Godal A, Apricena F, Giercksky KE, Nesland JM. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001;61:5824-5832
 - 45 Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, Rinkes IH, Jain RK, Fukumura D. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002;62:4289-4294
 - 46 Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, Kasran A, de Witte PA. Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2000;20:2579-2584
 - 47 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
 - 48 Barberi-Heyob M, Vedrine PO, Merlin JL, Millon R, Abecassis J, Poupon MF, Guillemin F. Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int J Oncol* 2004; 24:951-958
 - 49 Usuda J, Okunaka T, Furukawa K, Tsuchida T, Kuroiwa Y, Ohe Y, Saijo N, Nishio K, Konaka C, Kato H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int J Cancer* 2001;93:475-480
 - 50 Morgan J, Oseroff AR, Cheney RT. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor is decreased in skin cancers in comparison with normal skin. *Br J Dermatol* 2004;151:846-856
 - 51 Ortel B, Sharlin D, O'Donnell D, Sinha AK, Maytin EV, Hasan T. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2002;87:1321-1327
 - 52 Jiang FN, Liu DJ, Neyndorff H, Chester M, Jiang SY, Levy JG. Photodynamic killing of human squamous cell carcinoma cells using a monoclonal antibody-photosensitizer conjugate. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1218-1225
 - 53 Hemming AW, Davis NL, Dubois B, Quenville NF, Finley RJ. Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma. An evaluation of a new photosensitizing agent, benzoporphyrin derivative and new photoimmunoconjugate. *Surg Oncol* 1993;2:187-196
 - 54 Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:53-76